



# AUTOMATISATION DE L'ANALYSE D'IMAGES DE LA DIFFERENCIATION DES OLIGODENDROCYTES DANS LE CONTEXTE DE LA SCLEROSE EN PLAQUES.

Naïma AMMICHE

2022-2023

Encadrer par **VIOLETTA ZUJOVIC**

**Steph Whitmarsh**

Equipe MYELIN PLASTICITY AND REGENERATION

**ICM – INSTITUT DU CERVEAU ET DE LA MOELLE EPINIÈRE**

# Sommaire

<b>Remerciements</b>	<b>3</b>
<b>Introduction</b>	<b>4</b>
<b>Matériels et méthodes :</b>	<b>5</b>
<i>Acquisition des images :</i>	<i>5</i>
<i>Le logiciel ImageJ Fiji :</i>	<i>6</i>
<i>Description de la macro de comptage :</i>	<i>6</i>
Partie 1 : Acquisition des images	7
Partie 2 : Prétraitement de l'image	7
Partie 3 : Traitement de l'image	7
Partie 4 : Seuillage	8
Partie 5 : Addition des images	8
Partie 6 : Mesure	8
Partie 7 : Mise en page	8
<i>Description de la classification des oligodendrocytes :</i>	<i>9</i>
<i>Description du script python :</i>	<i>10</i>
Analyser les résultats du comptage :	10
Analyser les résultats de la classification :	10
<b>Résultats :</b>	<b>11</b>
<i>Acquisition des images</i>	<i>11</i>
<i>Quantification des astrocytes et oligodendrocytes</i>	<i>11</i>
<i>Classification des oligodendrocytes</i>	<i>13</i>
<b>Discussion</b>	<b>14</b>
<b>Conclusion</b>	<b>15</b>
<b>Références</b>	<b>15</b>
<b>Résumé</b>	<b>16</b>
<b>Summary</b>	<b>16</b>

## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à mon professeur, Mme. Delphine FLATTERS de l'Université Paris cité qui m'a aidé dans ma recherche du stage. Son écoute et ses conseils m'ont permis de cibler mes candidatures, et de trouver ce stage qui était en totale adéquation avec mes attentes.

Je tiens à remercier vivement Violetta ZUJOVIC et Stephen WHITMARSH, pour leur accueil et le partage de leur expertise au quotidien. Grâce aussi à leur confiance j'ai pu m'accomplir totalement dans mes missions.

Je remercie également toute l'équipe pour leur accueil, leur esprit d'équipe. Particulièrement Corinne BACHELIN pour son aide sur l'analyse d'images et ses conseils pour améliorer l'algorithme. STIMMER Lev pour son aide sur la compréhension d'images.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont conseillé et relu lors de la rédaction de ce rapport de stage ma famille, mes amis et camarade de promotion.

## Introduction

Le système nerveux central (SNC) est composé de l'encéphale et de la moelle épinière, il permet le contrôle de nombreuses fonctions du corps tel que la perception et les mouvements. Le SNC est composé de neurones et de cellules gliales. Les neurones peuvent recevoir ou transmettre des informations via l'influx nerveux. Les cellules gliales, comprenant, les oligodendrocytes, les astrocytes et les microglies ont des rôles essentiels dans le maintien de l'homéostasie, l'apport de nutriments, la transmission de signaux neuronaux et la défense du SNC (Figure 1). Les astrocytes qui jouent un rôle dans la transmission synaptique et l'homéostasie du SNC. Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du SNC, ils interviennent dans la réponse immunitaire et lors de la réparation tissulaire<sup>1</sup>. Les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du SNC, ils synthétisent de la myéline qui forme une gaine de protection autour des fibres nerveuses et permet une propagation plus rapide de l'influx nerveux. Au cours du développement, les cellules précurseurs des oligodendrocytes (OPC) prolifèrent et migrent et se différencient en oligodendrocytes matures pour myéliniser les axones. Les oligodendrocytes expriment des marqueurs spécifiques en fonction de leur état de différenciation.

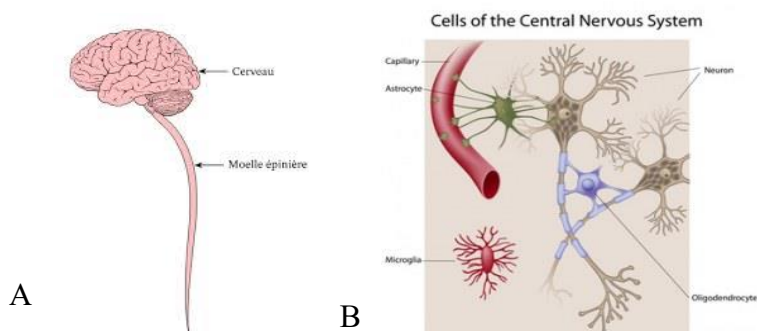


Figure 1 : Le système nerveux central se compose du cerveau et de la moelle épinière (A) et les principaux types cellulaires présents dans le SNC sont : 1)neurones. 2)Les oligodendrocytes. 3)Les astrocytes. 4)Les microglies(B).

L'intégrité de la gaine de myéline est essentielle pour la propagation de l'influx nerveux et la préservation des axones. Toute altération de cette structure entraîne des troubles cognitifs et moteurs. Dans la sclérose en plaques (SEP), la démyélinisation est causée par une réaction auto-immune contre la myéline. Cette maladie neurodégénérative est la deuxième cause nationale de handicap. Aucun traitement permet de guérir de la SEP cependant des traitements anti-inflammatoires permettent de diminuer les symptômes<sup>2</sup>.

Le système immunitaire joue un rôle important dans le développement des maladies démyélinisantes. Parmi les cellules immunitaires, les macrophages semblent jouer un rôle majeur. Ils ont la capacité de se différencier en macrophages pro inflammatoires (M1) ou pro régénératifs (M2) selon les signaux qu'ils reçoivent. Leur capacité à passer d'un état d'activation à un autre est essentiel dans la réparation des lésions de démyélinisation. A l'état

M1 ils agissent sur la prolifération et la migration des OPC et à l'état M2 ils agissent sur la différenciation des OPC en oligodendrocytes.

L'hypothèse de mon équipe est que les macrophages s'activent de manière incorrecte dans les maladies démyélinisantes ; soit en étant trop inflammatoires, soit pas assez pro régénératifs. Afin d'étudier, dans un modèle in vitro, les capacités d'activation des macrophages, en condition contrôle ou pathologique il nous faut évaluer l'effet que produit leur sécrétion sur la différenciation des oligodendrocytes. L'analyse consiste à quantifier les oligodendrocytes matures à partir de séries d'images. Mon projet a consisté à automatiser la quantification des différents types cellulaires et des différentes formes de différenciation des oligodendrocytes.

But de l'étude : L'objectif de mon stage a été de créer un algorithme afin d'automatiser la quantification des cellules pour évaluer les différents sous types de cellules (oligodendrocytes versus astrocytes). De classer les cellules oligodendrocytaires en fonction de leur état de différenciation et d'analyser les données quantitatives obtenues à partir des macros de comptage et de classification avec un script python. J'ai utilisé le logiciel ImageJ FIJI pour créer le programme d'analyse. Un script python pour analyser les résultats quantitatifs produit par le programme d'analyse.

## Matériels et méthodes :

### Acquisition des images :

Le sang des patients et donneurs contrôles est prélevé. Les monocytes sont isolés par gradient de Ficoll suivi d'une sélection à l'aide d'un anticorps CD14 (marqueur spécifique des monocytes). Les monocytes sont cultivés 72h en présence de GM-CSF pour les différencier en macrophages. Les macrophages sont ensuite traités 24h avec du GM-CSF, du LPS-IFN $\gamma$  ou de l'IL4 les activer respectivement dans un état neutre (M0), M1 ou M2.

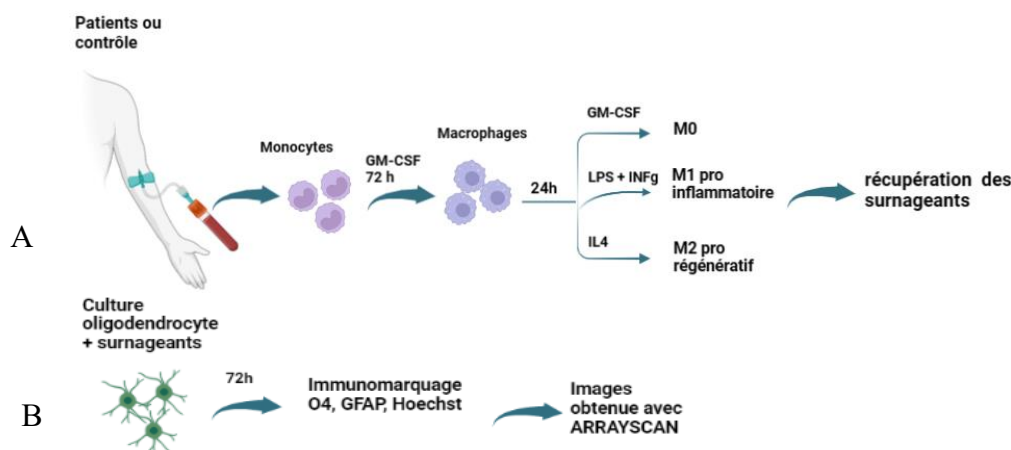


Figure 2 : Schéma représentant les étapes nécessaires pour obtenir les surnageants de cultures de trois conditions (A). Les étapes pour obtenir les images à analyser à partir de culture d'oligodendrocyte (B).

Le surnageant de culture des 3 conditions est récupéré et appliqué sur une culture d' OPC (*Figure 2A*). La culture est ensuite fixée et immunomarkée en fluorescence au bout de 72h. Les oligodendrocytes matures sont immunomarkés à l'aide d'un anticorps reconnaissant l'Antigène O4 (en vert), les astrocytes sont marqués avec l'anti GFAP (en rouge) et les noyaux sont colorés avec du Hoechst (en bleu). Les cellules sont ensuite imagées automatiquement avec un lecteur de plaques : l'ARRAYSCAN. Pour chaque image on a 3 fichiers images en niveau de gris correspondant aux canaux des trois marqueurs (rouge, vert, bleu) (*Figure 2B*). Ces images sont répertoriées dans des dossiers dont l'arborescence est la suivante, deux dossiers pour respectivement les patients et les contrôles. Chaque dossier contient des sous-dossiers représentant chaque puits.

### **Le logiciel ImageJ FIJI :**

Nous avons cherché des logiciels susceptibles de répondre à notre demande concernant la quantification des différents types cellulaires ainsi que la classification des oligodendrocytes à partir d'image en nuances de gris de manière automatisée. Comme aucun logiciel ou algorithme n'existait, j'ai construit une macro pour le logiciel ImageJ FIJI permettant de répondre à notre requête. Ce logiciel de traitement et d'analyse d'images en accès libre qui a des fonctionnalités supplémentaires possibles via l'ajout de plugins et macros. Une macro est un programme qui permet d'automatiser une série de commandes ImageJ. Une image est composée de pixel qui est la plus petite composante d'une image numérique. Lorsqu'une image comporte de nombreux pixels le niveau de détail est important. Il existe différents types d'image notamment à fluorescence, binaire, à nuances de gris. Notre étude porte sur les images à nuances de gris. L'analyse d'une image consiste à extraire des informations utiles pour sa compréhension. Par exemple sur une image comportant de nombreuses cellules, quantifier le nombre de cellule ou encore mesurer le volume de chaque cellule. Le traitement d'images consiste à poser une question biologique initiale, acquérir des images, réaliser un prétraitement pour améliorer la qualité de l'image, un seuillage, un traitement et enfin mesurer des caractéristiques souhaitées.

### **Description de la macro de comptage :**

Les images des noyaux permettent de détecter la présence de cellules. Les astrocytes et oligodendrocytes ont un marquage différent permettant respectivement de distinguer le cytoplasme des oligodendrocytes et le cytoplasme des astrocytes. L'addition de l'image contenant les noyaux à celle contenant le cytoplasme des oligodendrocytes permet d'obtenir une image avec uniquement les zones qui se superposent, l'image résultante contiendra seulement les noyaux des oligodendrocytes à quantifier. Le même processus est réalisé pour les

astrocytes avec une étape supplémentaire pour distinguer correctement l'ensemble du cytoplasme de ce type cellulaire. La macro de comptage permet de quantifier le nombre de noyaux, d'astrocytes et d'oligodendrocytes sur des images en nuances de gris. Ces quantifications sont enregistrées sur un fichier au format CSV pour faciliter l'analyse des résultats.

### **Partie 1 : Acquisition des images**

L'acquisition des images est décrite précédemment. Le lancement de la macro supprime les images ouvertes afin d'éviter la confusion lors de l'analyse des images souhaitées. La macro ouvre une fenêtre permettant une interaction avec l'utilisateur. L'utilisateur doit suivre les instructions présentes sur chaque fenêtre en sélectionnant le dossier qui contiendra les résultats, entrer le nom qu'il souhaite donner au fichier de sortie qui contiendra le comptage des cellules, choisir à partir de quel lot d'images l'analyse commence, cocher ou non l'option permettant d'afficher les images lors du processus et choisir le dossier contenant les images à analyser. L'utilisateur patiente jusqu'à la création du fichier, le temps nécessaire dépend de la quantité d'image à analyser.

### **Partie 2 : Prétraitement de l'image**

La macro parcourt chaque image du dossier et vérifie que l'extension soit au format TIF avant de poursuivre l'analyse, dans le cas contraire l'analyse s'arrête et l'utilisateur est informé. La macro parcourt précisément le dossier par lot de 3 images respectivement l'image des noyaux de l'ensemble des cellules, des oligodendrocytes et des astrocytes (*Figure 6 A1, A2, A3*). Un prétraitement est réalisé pour chaque image pour mettre à l'échelle et améliorer la qualité de l'image. La saturation et luminosité sont donc modifiées en utilisant la méthode *Enhance Contrast*. L'ajout d'un filtre médian permet de réduire le bruit de l'image sans la lisser. Les images obtenues sont ensuite dupliquées pour comparer ces images initiales à celles obtenue après traitement (*Figure 7*).

### **Partie 3 : Traitement de l'image**

L'image des noyaux peut comporter des noyaux qui sont très proches et se colle, pour les séparer et distinguer chaque noyau la méthode « Watershed » est utilisée. Concernant les images des oligodendrocytes et des astrocytes des étapes supplémentaires sont nécessaires. L'amélioration de la détection des contours est obtenue avec la méthode « Convolve » et l'option « Normalize Kernel » est appliquée.

## Partie 4 : Seuillage

La segmentation est réalisée pour chaque image, elle permet de séparer le fond des objets d'intérêt à partir d'un seuil défini. Nous obtenons une image binaire en blanc pour le fond et noir pour les objets d'intérêt. Dans notre cas, les objets d'intérêts sont les noyaux et cellules. La méthode `set AutoThreshold("Ostu dark")` avec l'argument « Ostu dark » permet de sélectionner les zones sombres comme seuil. Lorsque le seuillage est réalisé sur les astrocytes, le noyau n'est pas complètement seuillé, l'ajout d'une méthode « *Fill Holes* » permet de remplir la zone contenant les noyaux et permet un meilleur seuillage (*Figure 3*).

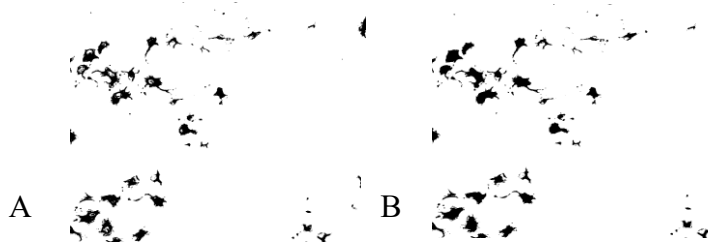


Figure 3 : Seuillage des astrocytes (marqués au GFAP) pour la première image du puits suite à la culture des OPC en présence de surnageant de macrophages contrôles traités avec GMCSF. La méthode *Fill Holes* n'est pas appliquée (A), la méthode *Fill Holes* est appliquée (B).

## Partie 5 : Addition des images

La méthode `imageCalculator` permet d'additionner deux images afin d'obtenir une image avec uniquement les zones communes à ces deux images. Pour quantifier le nombre de noyaux d'oligodendrocytes, nous avons additionné les images « noyau » et les images « oligodendrocyte ». Le même processus est réalisé avec l'image contenant les astrocytes et celle contenant les noyaux (*Figure 7, Addition des images*).

## Partie 6 : Mesure

La quantification des noyaux et des cellules est réalisée sur les images prétraitées et seuillées en utilisant les méthodes « *Set Measurements...* ». La méthode « *Analyze Particles...* » est ensuite utilisée avec le paramètre « *size* » qui permet de définir la taille minimale et maximale des noyaux qui seront comptabilisés, cette valeur est modifiée en fonction du type de cellules à quantifier. Le paramètre « *show=Masks* » permet de sélectionner l'objet à quantifier notamment les noyaux des oligodendrocytes et celui des astrocytes. Les résultats sont présents sur le « *summary* » et sont enregistrés dans un fichier au format CSV.

## Partie 7 : Mise en page

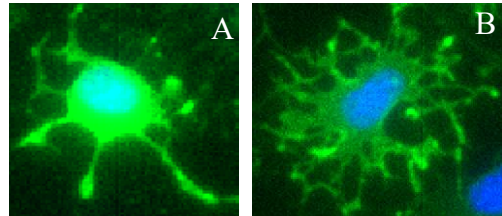
Lorsque l'option « affichée les images » lors du processus est cochée, les duplications des images d'écrites précédemment sont visibles par l'utilisateur. Les images sont analysées par lots de trois, lorsque ces trois images sont visualisées, la macro demande à l'utilisateur s'il souhaite poursuivre l'analyse pour le lot d'images suivantes.



## Description de la classification des oligodendrocytes :

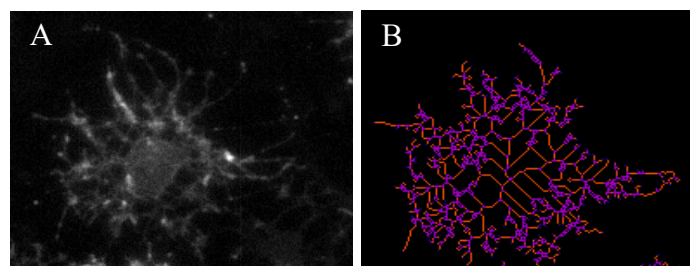
La morphologie des oligodendrocytes est un critère de classification. En fonction de la taille du cytoplasme et du nombre de ramifications, deux types d'oligodendrocytes sont distinguables. Les oligodendrocytes matures composés de plusieurs ramifications avec un compartiment cellulaire plus important et les oligodendrocytes immatures qui ont peu de ramification et un faible compartiment cellulaire (*Figure 4*).

Une classification supervisée, non supervisée ou réseau neuronal convolutif (CNN) n'est pas pertinent dans notre étude car ces classifications permettent une classification globale d'image et non une classification précise par image en considérant chaque cellule. L'analyse de chaque cellule



*Figure 4 : Morphologie d'un oligodendrocyte immature avec peu de ramification (A), mature avec plusieurs ramifications (B).*

oligodendrocytaire présente sur la même image permet une meilleure classification. Une approche consiste à créer une macro sur imageJ FIJI. Le lancement de la macro de classification des oligodendrocytes entre en interaction avec l'utilisateur qui peut choisir le dossier qui contiendra les résultats, le dossier contenant les images à analyser et choisit si les images s'affichent ou non lors du processus. Cette approche consiste à superposer l'image des noyaux seuillés avec l'image des cytoplasmes des oligodendrocytes seuillés (*Figure 7*) pour obtenir uniquement les noyaux des oligodendrocytes. Appliquer Voronoï sur cette superposition permet d'obtenir les délimitations de l'environnement occupé par chaque cellule. La superposition entre le cytoplasme des oligodendrocytes et le résultat du voronoï est réalisée ce qui permet d'isoler chaque oligodendrocyte. La méthode « Skeleton » est ensuite utilisée pour obtenir le squelette des cellules oligodendrocytaires et pouvoir appliquer le plugin « Analyze Skeleton 2D/3D ». Ce plugin présent sur imageJ FIJI permet d'analyser le squelette des cellules et recueillir des informations sur le nombre de branches, le nombre de jonctions (*Figure 5*) ainsi que d'autres caractéristiques sur la cellule. Ces résultats sont enregistrés dans un fichier au format CSV par image, chaque ligne correspond à une cellule présente sur l'image et les colonnes correspondent aux différentes



*Figure 5 : Représentation d'une image d'un oligodendrocyte en nuances de gris (A) et son squelette obtenu avec le plugin « Analyze skeleton 2D/3D » (B). Les jonctions sont représentées (en violet), les terminaisons (en bleu) et les branches (en orange).*

caractéristiques de la cellule. Un script python permet ensuite d'analyser ces données quantitatives avec les bibliothèques pandas, matplotlib, glob et os.

### **Description du script python :**

Le script python permet d'ouvrir les fichiers au format CSV obtenus avec les macros de comptage des différents types cellulaires et macro de classification des oligodendrocytes. Ces fichiers comportent des données quantitatives qui sont analysées pour extraire les informations que l'on souhaite. Ce script est rédigé sur Jupyter Notebook pour faciliter son utilisation et pouvoir ajouter des sections texte permettant d'expliquer ou interpréter le code et résultats obtenus. Les bibliothèques nécessaires sont **pandas** qui permet la manipulation et analyse des données et **matplotlib** qui permet de tracer et visualiser des données sous forme de graphique.

### **Analyser les résultats du comptage :**

Le fichier au format CSV obtenu par la macro de comptage contient en ligne les différentes images du dossier et en colonne des caractéristiques tel que le comptage et l'air total des cellules. Ces données sont parcourues à l'aide du script python. Le pourcentage d'oligodendrocytes et d'astrocytes est calculé pour chaque image et pour l'ensemble des images du dossier. Lorsque le pourcentage est aberrant c'est-à-dire inférieur à 0% ou supérieure à 100%, l'utilisateur en est informé via un message comportant le numéro de l'image responsable de ce pourcentage afin de cibler l'origine du problème rapidement. Des graphiques permettent de visualiser le pourcentage d'astrocytes et d'oligodendrocytes dans le puits analysé.

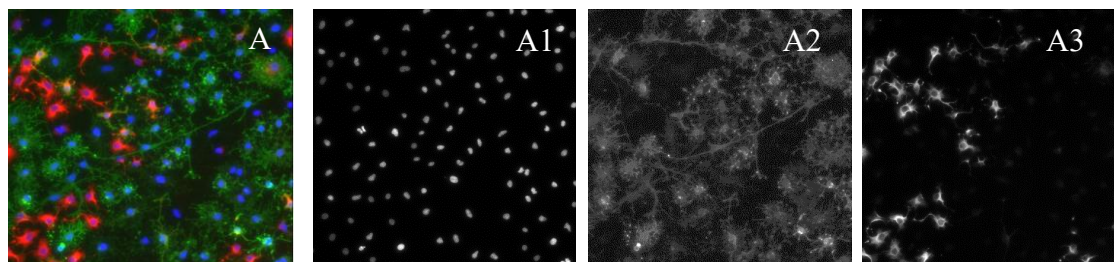
### **Analyser les résultats de la classification :**

Les fichiers au format CSV obtenus avec la macro de classification d'oligodendrocytes sont nombreux. La première étape consiste à concaténer l'ensemble des fichiers au format CSV pour avoir uniquement un fichier CSV et donc un data frame. Chaque ligne correspond à une cellule présente dans le puits et les colonnes à différentes caractéristiques de cette cellule tels que le nombre de branches et le nombre de jonctions. Le paramètre « nombre de branches » est analysé et reflète l'état de différenciation des oligodendrocytes. Les oligodendrocytes sont alors classifiés en quatre groupes en fonction de leur nombre de branches : 1/ moins de 150 branches (peu différenciés), 2/ entre 150 et 300 branches, 3/ entre 300 et 450 branches et 4/ supérieur à 450 branches (très différenciés).

## Résultats :

### Acquisition des images

ARRAYSCAN permet d'obtenir plusieurs images à fluorescence par puits (*Figure 6A*). Pour chaque image, trois images en niveau de gris correspondent aux canaux des trois marqueurs rouge, vert, bleu (*Figure 6A1, A2 et A3*). Ces images à niveaux de gris sont analysées pour obtenir des informations sur le nombre de cellules présentes et distinguer, selon leurs morphologies, les oligodendrocytes immatures et matures.



*Figure 6 : Image à fluorescence obtenue par ARRAYSCAN pour la première image du puits dont le surnageant des macrophages contrôles traités avec GMCSF a été appliqué sur une culture d'oligodendrocytes. Les oligodendrocytes matures sont marqués avec O4 en vert (A, A2), les astrocytes sont marqués avec l'anti GFAP en rouge (A, A3) et les noyaux sont colorés avec du Hoechst en bleu (A, A1). Trois images en niveau de gris correspondent aux canaux des trois marqueurs bleu (A1), vert (A2), rouge (A3).*

### Quantification des astrocytes et oligodendrocytes

La macro de comptage est appliquée sur chaque images du puits (*Figure 7*). Les étapes décrites dans la section « description de la macro de comptage » sont réalisées pour obtenir les quantifications de chaque type cellulaire. Les étapes de prétraitement et traitement de l'image permettent une détection améliorée des cellules présentes sur l'image (*Figure 7, Pré traitement*). L'étape du seuillage permet d'obtenir une image binaire avec en noir les objets d'intérêt (*Figure 7, Seuillage*). L'étape traitement permet d'obtenir l'image résultant de l'addition de l'image des noyaux à celle du cytoplasme des cellules (*Figure 7, Addition des images*), la quantification est réalisée sur ces images, chaque rond noir correspond à un noyau et par conséquent à une cellule. Ces résultats sont enregistrés dans un fichier CSV.

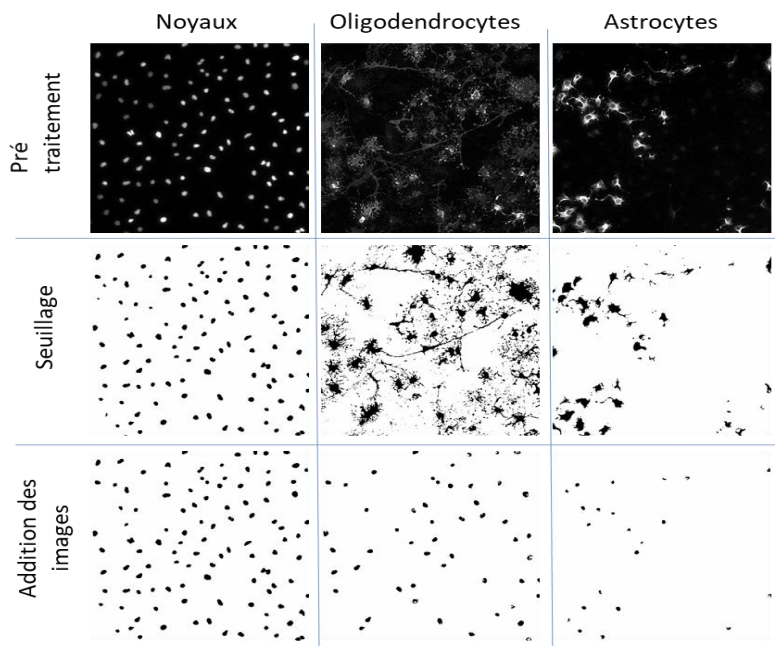


Figure 7 : Traitement des images à niveaux de gris pour la première image du puits dont le surnageant des macrophages contrôles traités avec GMCSF a été appliqué sur une culture de précurseur d'oligodendrocytes. 1) Les noyaux, 2) les oligodendrocytes et 3) les astrocytes. Les images obtenues à chaque étape le prétraitement (A), le traitement suivi du seuillage et post-traitement (B). L'addition des images pour obtenir les noyaux des oligodendrocytes et ceux des astrocytes suivis de la quantification de ces noyaux (C).

Les OPC se différencient préférentiellement en astrocytes en présence du surnageant de macrophage pro inflammatoire (Figure 8A) et en oligodendrocytes dans les conditions pro régénératives (Figure 8B). Le pourcentage d'astrocytes à la suite du traitement avec les surnageant des macrophages de donneurs sains est proche de 20% dans les conditions neutres (GMCSF), 10% en condition pro régénératives (IL4) et 40% en condition pro inflammatoire (LPS) (Figure 8A, bleu). Le pourcentage d'oligodendrocytes chez le contrôle est proche de 30 % avec GMCSF, 40% avec IL4 et 25% avec LPS (Figure 8B, bleu). Ces résultats correspondent aux résultats attendus. Dans les conditions pathologiques, avec le surnageant du SEP, nous observons une diminution du pourcentage d'astrocytes et d'oligodendrocytes (Figure 8, orange) comparé au surnageant des macrophages contrôles (Figure 8, bleu) quel que soit les traitements des macrophages. Dans les conditions SEP, on évalue le pourcentage d'astrocytes proche de 10% avec GMCSF et IL4 et 35% avec LPS (Figure 8 A, orange).

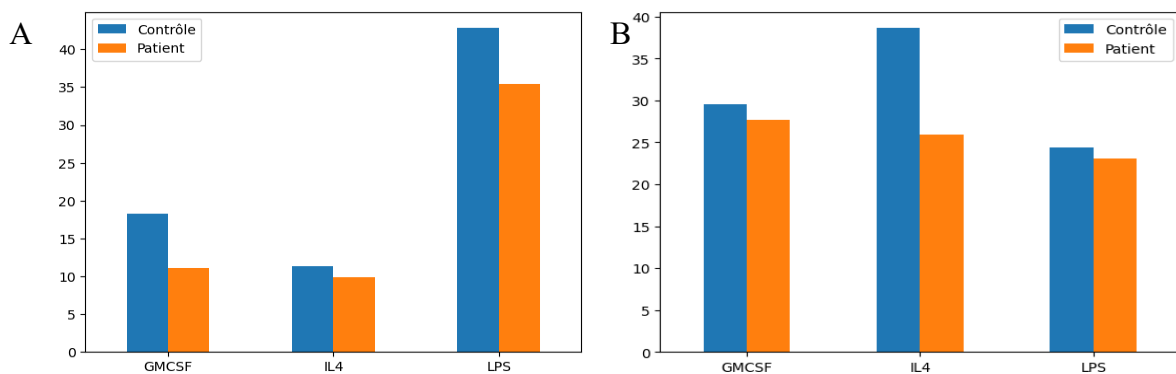


Figure 8 : Représentation graphique du pourcentage d'astrocytes (A) et d'oligodendrocytes (B) pour les contrôles (en bleu) et patients (en orange) en fonction du surnageant GMCSF, IL4 et LPS.

Dans la condition SEP le pourcentage d'oligodendrocytes est à 25% indépendamment du traitement appliqué sur les macrophages. On observe notamment une forte différence de pourcentage d'oligodendrocytes (*Figure 8B*) dans la condition pro régénérative (IL4) entre contrôle (bleu) et patient (orange). Ces résultats pourraient expliquer l'absence de régénération de la gaine de myéline à la suite d'un stimulus pro régénératif chez le patient SEP.

## **Classification des oligodendrocytes**

Les oligodendrocytes matures et oligodendrocytes immatures sont classés en fonction de leurs morphologies. Le nombre de branches est plus important chez les oligodendrocytes matures comparé aux oligodendrocytes immatures (*Figure 4*). Les étapes décrites dans la section « Description de la classification des oligodendrocytes » sont réalisées (*Figure 9*). Les étapes de prétraitement et seuillage sont similaires à celles de la macro de comptage (*Figure 7*). L'image contenant uniquement les noyaux des oligodendrocytes est obtenue (*Figure 7, Addition des images*). Le voronoi est appliqué sur cette image pour délimiter l'espace potentiellement occupée par la cellule. Une addition entre l'image seuillée des cytoplasmes d'oligodendrocytes et l'image avec voronoi permet de récupérer les cytoplasmes des oligodendrocytes sans dépasser les zones potentiellement occupées, le squelette de ces cellules est ensuite récupéré (*Figure 9A*). Le squelette des cellules permet d'avoir des informations sur le nombre de branches en exécutant le plugin « Analyze skeleton 2D/3D » (*Figure 9B*). Ce plugin permet de visualiser pour chaque cellule présente sur une image de nombreuses caractéristiques telles que le nombre de branches, le nombre de jonctions, la longueur maximale de la branche. Le caractère utilisé pour classer les oligodendrocytes dans notre cas est le nombre de branches. Quatre classes d'oligodendrocytes sont identifiées (*Figure 10*).

Les résultats de cette quantification sont présentés sous forme d'un graphe réunissant toutes les conditions de différenciation avec les macrophages contrôles ou patient (*Figure 10*). Ainsi nous observons que les oligodendrocytes non différenciés (*Figure 10*, gris) sont majoritaires chez le patient indépendamment des conditions. De manière surprenante, la quantité de cellules indifférenciées augmente suite au stimulus IL4 en condition contrôle et patient.

Les oligodendrocytes différenciés entre 150 et 300 branches (*figure 10*, bleu clair) augmentent suite au stimulus pro régénératif en condition contrôle et diminuent en condition patient. Un état pro inflammatoire induit une augmentation importante des oligodendrocytes fortement différenciés entre 300 et 450 branches (*Figure 10*, bleu foncé) et avec plus de 450 branches

(Figure 10, bleu nuit) en condition contrôle, cette augmentation étant moindre en condition patient.

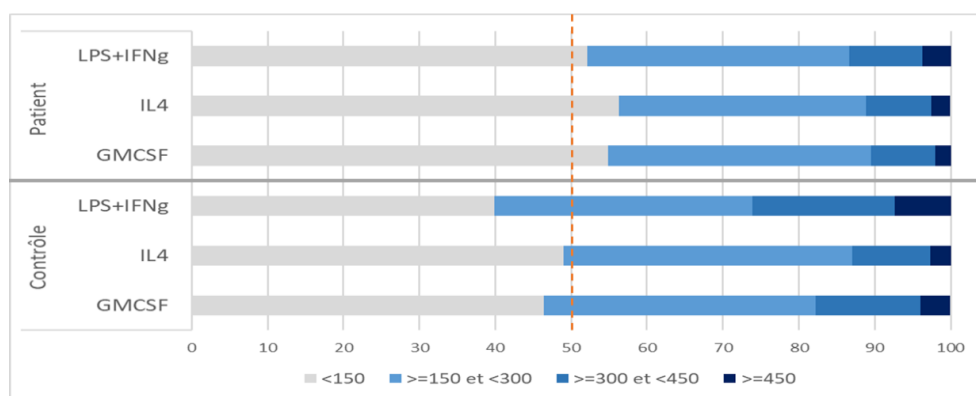
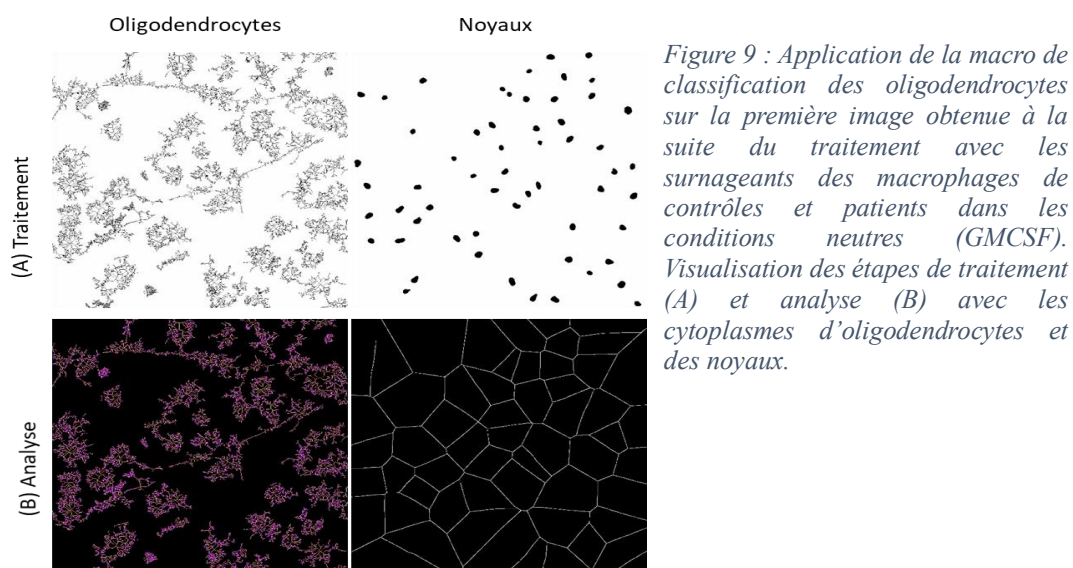


Figure 10 : Classification des oligodendrocytes à la suite du traitement avec les surnageants des macrophages de contrôle et patient dans les conditions neutres (GMCSF), en condition pro régénératives (IL4) et en condition pro inflammatoire (LPS). Oligodendrocytes non différenciés avec moins de 150 branches (en gris), oligodendrocytes différenciés entre 150 et 300 branches (en bleu claire), entre 300 et 450 branches (en bleu foncé) et supérieur à 450 branches (en bleu nuit).

## Discussion

Une étude précédente a mis en évidence que les macrophages de patient SEP présentaient une tendance pro inflammatoire plus importantes que les cellules de donneurs sains. Afin de vérifier quelles étaient les conséquences fonctionnelles de cette activation inflammatoire des macrophages de patient SEP, mon équipe a mis en place un système de culture de progéniteurs d'oligodendrocytes en présence de surnageants de macrophages de donneurs sains (contrôle) ou de patient SEP (patient) qui ont été différenciés dans des conditions neutres pro régénérative et pro inflammatoire. Nous avons ensuite voulu identifier tout d'abord la proportion de ces progéniteurs qui devenaient des astrocytes ou des oligodendrocytes et ensuite parmi les cellules oligodendrocytaires celles qui étaient différenciées en évaluant le nombre de branchements par cellules. Suite à l'automatisation des comptages de cellules j'ai mis en évidence que les

macrophages contrôles ont une proportion d'oligodendrocytes variable en fonction du traitement, ce pourcentage augmentant en condition IL4. Le patient a pourcentage d'oligodendrocytes inférieur à celle des donneurs sains et ce pourcentage ne varie pas selon le traitement. Ainsi nous observons qu'un traitement pro régénératif ne permet pas aux macrophages de patient SEP de favoriser la différenciation des OPC vers un lignage oligodendrocytaire. En plus de cette diminution d'oligodendrocytes, on observe dans la condition patient une diminution des branchements des oligodendrocytes ; ainsi les oligodendrocytes avec moins de 150 branchements sont majoritaires chez le patient indépendamment des conditions. Les oligodendrocytes différenciés entre 150 et 300 branches augmentent en condition pro régénérative chez le contrôle et diminuent chez le patient. Un état pro inflammatoire induit une augmentation importante des oligodendrocytes fortement différencié avec plus de 300 branches chez le contrôle, cette augmentation est moins importante chez le patient conduisant à l'absence de régénération de la gaine de myéline chez le patient en condition pro inflammatoire et pro régénérative. Tous ces résultats mettent en évidence qu'une des explications du manque de régénération de la myéline dans la SEP pourraient provenir de l'incapacité des macrophages du patient d'acquérir une forme pro régénérative correcte et de produire des molécules favorisant la différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes vers l'oligodendrocytes mais aussi la maturation de ces oligodendrocytes.

## **Conclusion**

Les macros et script python décrits dans le matériel et méthode ont permis d'automatiser le comptage des astrocytes et oligodendrocytes ainsi que la classification en quatre classes des oligodendrocytes. Les résultats montrent que le patient ne produit pas d'oligodendrocytes en condition pro régénérative donc la quantité d'oligodendrocytes est constante indépendamment des conditions. Les oligodendrocytes sont majoritairement non différenciés chez le patient indépendamment des conditions et la proportion d'oligodendrocytes différenciés diminue en condition pro régénérative. Chez le patient en condition pro régénérative, une faible production d'oligodendrocytes combiné à une faible quantité d'oligodendrocytes différenciés pourrait causer une absence de régénération de la gaine de myéline causant ainsi une détérioration du SNC.

## **Références**

1. Vainchtein I. D. & Molofsky A. V., Astrocytes and microglia: in sickness and in health, Trends Neurosci, 144-154 (2020).
2. La sclérose en plaques (SEP) : causes, mécanismes, symptômes et traitements, ICM

## Résumé

Les maladies neurodégénératives altèrent le système nerveux central. Ces maladies sont fréquentes et aucun traitement curatif existe. La sclérose en plaques est une maladie auto-immune classée deuxième cause de handicap avec une prévalence de 3 000 nouveaux cas par an. Cette maladie détruit la gaine de myéline, protectrice des neurones et altère ainsi le système nerveux central. Les oligodendrocytes à la suite du traitement avec les surnageants des macrophages de donneurs sains et patient dans les conditions neutres (GMCSF), en condition pro régénérative (IL4) et en condition pro inflammatoire (LPS) sont quantifiés et classés en quatre classes selon leurs morphologies. Les oligodendrocytes non différenciés avec moins de 150 branches, oligodendrocytes différenciés entre 150 et 300 branches, entre 300 et 450 branches et supérieur à 450 branches. L'objectif est de quantifier le nombre d'astrocytes et d'oligodendrocytes et classer les oligodendrocytes selon leurs morphologies de manière automatisée. Actuellement les images sont analysées manuellement ou de manière semi-automatique, aucun algorithme n'existe pour répondre entièrement à notre requête. Des macros sont réalisées avec le logiciel imageJ. Un script python est créé pour analyser les résultats quantitatifs et produire des graphiques qui sont facilement interprétables.

## Summary

Neurodegenerative diseases affect the central nervous system. These diseases are common, and there is no cure. Multiple sclerosis is an autoimmune disease, the second most common cause of disability, with 3,000 new cases every year. The disease destroys the myelin sheath that protects neurons, thereby altering the central nervous system. Oligodendrocytes following treatment with macrophage supernatants from healthy donors and patients under neutral (GMCSF), pro-regenerative (IL4) and pro-inflammatory (LPS) conditions are quantified and classified into four classes according to their morphologies. Undifferentiated oligodendrocytes with fewer than 150 branches, differentiated oligodendrocytes between 150 and 300 branches, between 300 and 450 branches and greater than 450 branches. The aim is to quantify the number of astrocytes and oligodendrocytes and classify oligodendrocytes according to their morphologies in an automated way. At present, images are analyzed manually or semi-automatically, and no algorithm exists to fully meet our requirements. Macros are created using imageJ software. A python script is created to analyze the quantitative results and produce graphs that are easy to interpret.